

表达猪传染性胃肠炎病毒 S 基因的重组乳酸乳球菌 的构建及免疫原性分析

唐丽杰 欧 笛 葛俊伟 徐义刚 李一经*

(东北农业大学动物医学院 哈尔滨 150030)

摘 要 根据猪传染性胃肠炎病毒纤突(S)蛋白的全基因序列及表达载体质粒的基因融合特点,设计一对引物,进行 PCR 扩增,获得含有 TGEV S 基因 4 个主要抗原位点的约 2000bp 的目的片段,将其与分泌表达的载体质粒 pNZ8112 进行连接,通过电击转化进入宿主菌乳酸乳球菌 NZ9000 细胞内,在乳链菌肽(Nisin)的诱导下进行表达,通过 SDS-PAGE 和 Western blot 分析,表明 TGEV S 蛋白在乳酸乳球菌中获得表达,所表达的 TGEV S 蛋白具有与 TGE 病毒一样的抗原特异性。间接免疫荧光试验表明重组菌表达蛋白定位于菌体表面。将表达 TGEV S 蛋白的重组乳酸乳球菌及空质粒菌株分别口服免疫 BALB/c 小鼠,收集粪便样品进行抗体检测,结果表明分泌型的重组菌 pNZ8112-Sa/NZ9000 免疫小鼠能够产生明显的抗 TGEV sIgA 抗体。

关键词: TGEV S 蛋白;乳酸乳球菌;表面表达;免疫原性分析

中图分类号: Q933 **文献标识码**: A **文章编号**: 1001-6209(2007)02-0340-05

猪传染性胃肠炎(Transmissible gastroenteritis, TGE)是由冠状病毒科猪传染性胃肠炎病毒(Transmissible gastroenteritis virus, TGEV)引起的以仔猪呕吐、严重腹泻和高致死率为特征的消化道传染病^[1]。该病是我国及世界各养猪国家仔猪早期死亡的重要疫病之一。疫苗免疫接种是预防本病的主要措施。实践证明,肠道黏膜免疫所产生的分泌型抗体(sIgA)是抵抗 TGEV 感染的有效抗体^[2,3],而非经口免疫所产生的其它血清抗体,如 IgG、IgM 对本病的免疫保护效果并不理想。因此选择安全无毒,能够在肠道中存活并能表达和传递抗原物质的载体系统^[4~6],有效地刺激黏膜免疫系统产生的黏膜免疫应答对本病的防治具有重要意义。

TGEV 有 3 种主要结构蛋白,分别为磷酸化的核衣壳蛋白 N、膜蛋白 M 和糖基化的纤突蛋白 S^[7]。其中 S 糖蛋白携带主要的 B 淋巴细胞抗原决定簇,是唯一能诱导产生中和抗体和提供免疫保护作用的结构蛋白。S 蛋白含有宿主细胞氨肽酶受体(PAPN)的识别位点,因此, S 蛋白对病毒感染、发挥其致病性和决定宿主细胞亲嗜性方面起关键作用^[8~12]。

基于 TGEV 的肠道致病特点和黏膜免疫特点,

本研究以 TGEV 起主要免疫保护作用的囊膜蛋白基因(S 基因)主要抗原位点片段 Sa 插入到乳酸菌表达载体,构建了表达 TGEV S 蛋白的重组乳酸菌表达系统,以期获得 TGEV 口服活菌疫苗,依靠乳酸菌天然的抗菌抗腹泻作用和 S 蛋白刺激的特异性黏膜免疫作用,达到预防本病的目的。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株:乳酸乳球菌表面表达载体 pNZ8112 及乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis* NZ9000 由荷兰 NIZO 研究所惠赠,质粒 pUC-S 含有猪传染性胃肠炎病毒 S 基因,由本实验室构建^[13]。

1.1.2 引物:应用 oligo6.0 软件设计引物,引物 TS7:5'-CTTGCATGCATGAAAACTGTTCTGTTCTCTGTTGTAAT-3' 与 TS8:5'-CGTCTAGACACACCACTATTATCAGACGGTACACCCACTATGTTG-3' 用于从质粒 pUC-S 上扩增含有 S 基因 A、B、C 和 D 4 个主要抗原位点的片段,上下游引物分别含有 *Sph* I 与 *Xba* I 酶切位点(下划线标出)。引物由上海生物工程有限公司合成。

基金项目 国家自然科学基金(30371074)

* 通讯作者。Tel 86-451-55190385 E-mail yijingli@yahoo.com

作者简介:唐丽杰(1971-),女,吉林省梨树县人,讲师,在读博士,从事分子病毒学研究。E-mail tanglijie@163.com

其他作者 史 达 夏春丽 郝 茵

收稿日期:2006-07-05 接受日期:2006-09-04 修回日期:2006-11-08

1.1.3 主要试剂:兔源抗 TGEV 高免血清本实验室制备,乳链菌肽(Nisin),HRP 标记的羊抗鼠 IgA、HRP 标记的羊抗兔 IgG 均购自 Sigma 公司;FITC 标记的羊抗兔 IgG 购自中杉金桥生物技术有限公司,其它生化试剂均为国产分析纯产品。

1.2 TGEV S 基因乳酸乳球菌表达载体的构建

以质粒 pUC-S 为模板,以 TS7 和 TS8 为引物扩增含有 TGEV S 基因 A、B、C 和 D 主要抗原位点的片段,命名为 Sa,PCR 产物经胶回收纯化后与载体质粒进行酶切、连接。将连接产物与电转化感受态细胞 NZ9000 混匀后,冰上放置 5min,将其转入 2mm 的预冷电转化杯(Bio-Rad 公司)中;以 Transformation Apparatus 165-2101 电击,电击参数为电压 2.5kV,时间为 5ms;电击后加入 900 μ L 冰预冷的 SGM17MC (GM17 液体培养基,加入 0.5mol/L 蔗糖,0.02mol/L 氯化镁,0.002mol/L 氯化钙)恢复培养基,混匀,将菌液转移至 1.5mL 离心管中,冰上放置 10min,30℃厌氧培养 2h,取适量菌液涂布于含有 5 μ g/mL 氯霉素的 GM17 琼脂培养基上,30℃厌氧培养 2~3d。于平板上挑取单个菌落,分别接种于含有 5 μ g/mL Cm 的 GM17 液体培养基中,30℃厌氧培养过夜后,按 Anderson 等^[14,15]方法从乳酸乳球菌中提取质粒。对重组质粒进行酶切鉴定、PCR 鉴定及序列测定分析,将转化获得重组质粒乳酸乳球菌命名为 pNZ8112-Sa/NZ9000。

1.3 TGEV S 蛋白在乳酸乳球菌中的诱导表达

pNZ8112-Sa/NZ9000 阳性重组菌及 pNZ8112/NZ9000 空质粒对照菌,接种于 GM17 液体培养基中,30℃厌氧培养过夜后,取过夜培养物以 1:25 比例接种于 20mL 培养基中,30℃培养至 OD_{600} 为 0.4 左右;取 10mL 细菌培养液用 1ng/mL 的乳链杆菌肽 Nisin 诱导 2~3h。终止培养后分别取出 1mL 样品以 12000r/min 离心 3min,弃上清;用 200 μ L PBS 溶液悬浮,12000r/min 离心 3min,弃上清;加入 100 μ L 10mg/mL 的溶菌酶,37℃水浴放置 30min,沸水浴 5min,灭活溶菌酶,12000r/min 离心 3min,弃上清;加入 1 \times PBS($OD_{600} \times 50\mu$ L)及等量 2 \times SDS 凝胶加样缓冲液(含 DTT),充分混匀,煮沸 10min,12000r/min 离心 3min,取上清 10 μ L 上样,以蛋白质标准分子量为参考,10% SDS-PAGE 进行电泳分析。

1.4 表达产物的鉴定

1.4.1 免疫印迹:SDS-PAGE 结束后,将凝胶经

SAV140 型 MINI BLOT MOUDLE 转印装置将蛋白转移到经转印缓冲液平衡的硝酸纤维素膜上,接通电源 0.5~1mA/cm² 转印 1h。转印结束后,兔抗 TGEV 血清作为第一抗体,以辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 作为第二抗体,4-氯-1-萘酚底物显色溶液中显色 20min。

1.4.2 间接免疫荧光:取 12h 培养阳性重组菌和空载体对照菌液体培养物 0.5mL 离心去上清后,分别用 PBS 低速离心洗 3 次,加入兔源抗 TGEV 抗血清,悬浮混合后 37℃作用 30min,离心去上清,PBS 离心洗菌体 3 次,加入稀释的含有伊文思蓝的抗兔荧光标记二抗,悬浮混合后 37℃作用 30min,离心去上清,PBS 离心洗菌体 3 次,菌体沉淀物悬浮在 200 μ L PBS 取适量涂片,自然干燥,冷丙酮固定 30min,干燥后荧光显微镜观察。

1.5 试验动物分组及免疫

体重 18~20g 6~8 周龄清洁级 BALB/c 小鼠,购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心。将其以每组 15 只随机分成 3 组,即 PNZ8112-Sa/NZ9000 实验组、PNZ8112/NZ9000 质粒对照组和 PBS 对照组,实验组和质粒对照组每只小鼠以 2×10^{10} 个/mL 细菌口服接种 0.1mL,每隔 2 周免疫一次,每次连续免疫 3d。共免疫 3 次,PBS 对照组口服同体积的 PBS 液。

1.6 免疫小鼠粪便特异性 sIgA 测定

采用间接 ELISA 方法进行。收集免疫组小鼠粪便,每 0.1g 粪便加入 1mL 粪便提取液,4℃浸润过夜。10000r/min 离心 5min,收集上清。以 TGEV 全病毒抗原包被 96 孔聚苯乙烯微量板 37℃反应 2h,0.01mol/L PBST 液洗 3 次。用含有 0.5% 聚乙烯醇的 0.01mol/L PBS 液 37℃封闭 4h,0.01mol/L PBST 液洗 3 次。分别加入处理好的粪便上清,37℃反应 1h,0.01mol/L PBST 洗 3 次。加入 1:2000 稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgA,37℃反应 1h,0.01mol/L PBST 液洗 3 次。加 OPD-H₂O₂ 底物显色液避光显色 15min。加终止液后,自动酶标测定仪在波长 492nm 处测定每孔的光吸收(OD_{492})值。

2 结果

2.1 乳酸乳球菌表达载体的酶切鉴定及序列分析

经 PCR 扩增得到的约 2000bp 片段经胶回收纯化,与载体质粒同时用相应的限制性内切酶进行双

酶切并以胶回收试剂盒进行回收纯化后进行 16℃ 过夜连接 ,连接产物电转化入宿主菌 NZ9000 ,阳性重组质粒 PCR 鉴定后得到约 2000bp 的目的片段 ,单双酶切鉴定后分别得到与预期结果相一致的 5300bp、2000bp 和 3300bp 的目的片段。序列测定结果分析表明 TGEV Sa 基因片段已插入到表达载体质粒 pNZ8112 的酶切位点 *Sph* I 与 *Xba* I 之间 ,pNZ8112-Sa 重组质粒为具有分泌信号肽序列的表达质粒 ,获得的阳性重组菌命名为 pNZ8112-Sa/NZ9000 菌株。

2.2 TGEV S 蛋白在乳酸乳球菌中的诱导表达及蛋白检测

对重组的 pNZ8112-S/NZ9000 菌株和 pNZ8112/NZ9000 空质粒的菌的诱导结果表明 ,重组蛋白获得了表达 ,蛋白大小约在 66kDa 左右。通过 Western blot 检测表明重组蛋白具有与 TGE 全病毒制备的抗血清发生反应的能力 ,并具有良好的特异性 ,即反应原性(图 1)。

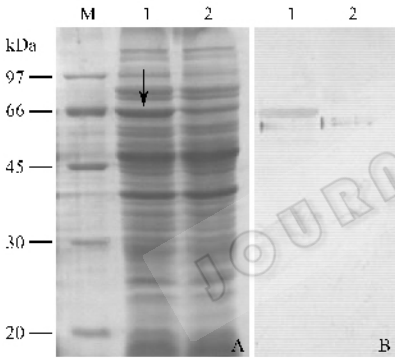


图 1 表达产物的 SDS-PAGE(A)和 Western blot(B)分析
Fig.1 The SDS-PAGE(A)and Western blot(B)analysis of the expressed product. M. Protein Marker ;A1 Proteins from *Lactococcus lactis* NZ9000 harboring the recombinant plasmid pNZ8112-Sa induced by Nisin ; A2 : Proteins from *Lactococcus lactis* NZ9000 harboring the plasmid pNZ8112 induced by Nisin ; B1 :Western blot analysis of the product of pNZ8112-Sa/NZ9000 ; B2 :Western blot analysis of the product of pNZ8112/NZ9000. As the arrow indicated for the expressed protein.

2.3 TGEV S 蛋白在乳酸乳球菌中诱导表达的间接免疫荧光检测

以 pNZ8112-Sa/NZ9000 重组菌和 pNZ8112/NZ9000 对照菌所进行的间接免疫荧光实验结果表明 ,重组菌 pNZ8112-Sa/NZ9000 荧光显微镜检查可见明显的黄绿色荧光(图 2-A) ,由此也表明 ,重组菌所表达的外源蛋白是存在于菌体的表面位置 ;pNZ8112/NZ9000 未发现绿色荧光 ,菌体被染成红色(图 2-B)。

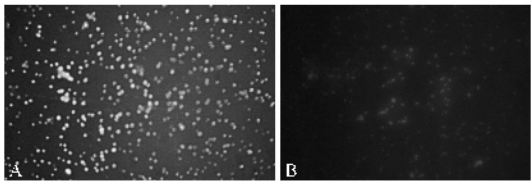


图 2 表达产物的间接免疫荧光检测(40×)
Fig.2 Detection of the expressed product by indirect immunofluorescence tests(40×). A :The IFA result of the recombinant strain of pNZ8112-Sa/NZ9000 , and the bacterium cells showed strong yellow and green fluorescent ; B :The IFA result of the recombinant strain of pNZ8112/NZ9000 , and there is no fluorescence reaction. The cells were stained red.

2.4 重组乳酸乳球菌免疫小鼠特异性 sIgA 测定

分别于免疫前及初次免疫后 18d、32d、38d 收集小鼠粪便检测抗体 sIgA 水平。重组乳酸乳球菌 pNZ8112-Sa/NZ900 在连续 3 次免疫后诱导小鼠产生了明显的抗 TGEV-S 蛋白的分泌性 sIgA 抗体反应。最后一次免疫后 8d(初次免疫后 38d) ,pNZ8112-Sa/NZ9000 重组菌免疫小鼠粪便中仍可以检测到抗 TGEV S 蛋白 sIgA 抗体。免疫空载体转化菌 pNZ8112/NZ9000 的小鼠和阴性对照组小鼠在免疫前后分泌性 sIgA 抗体水平未出现明显差别(图 3)。

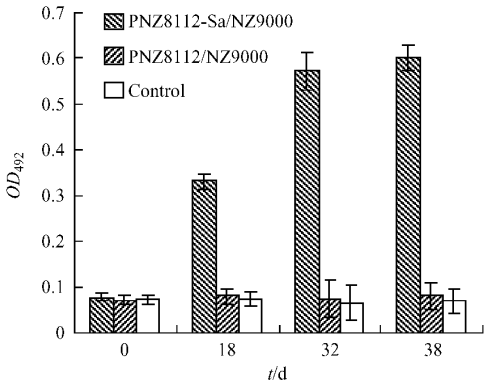


图 3 重组菌免疫小鼠粪便中特异性抗 TGEV sIgA 水平(OD₄₉₂)
Fig.3 Specific sIgA level anti-TGEV in fecal material of mice immunized with recombinant strain(OD₄₉₂).

3 讨论

TGEV 感染具有明显的肠嗜性^[8]。病毒粒子表面的纤突蛋白(S 蛋白)与存在于肠上皮细胞顶膜的氨基肽酶(APN)的结合是感染发生的首要条件 ,黏膜免疫是本病特异性免疫应答的主要特征 ,肠道黏膜表面 sIgA 含量的高低直接决定临床疾病的发生和疾病严重程度^[12,16]。乳酸菌作为表达和传递异质

性抗原的活载体系统具有许多优点,如载体对动物本身是安全的,而大肠杆菌、沙门氏菌作为活载体系统就不能称谓安全的生物制剂;某些乳酸菌又可合成一些生物活性物质和多种有机酸类,这些物质本身具有抑菌抗菌、抗腹泻作用^[16,18]。

本研究针对 TGE 发生和免疫的几个特点,在试验设计上以阻断肠道传染性疾病病原感染的第一道防线为目的,利用安全无毒的乳酸菌表达系统在肠道黏膜上粘附、定植和表达及传递抗原物质,因而抗原物质对黏膜的免疫刺激作用更接近于病毒的自然感染途径,因此所产生的黏膜免疫保护效果将更为理想^[17]。本研究中构建了冠状病毒 TGEV S 蛋白乳酸乳球菌表达载体系统,表达了含有 TGEV S 蛋白 A、B、C、D 4 个主要抗原位点的约 66kDa 的目的蛋白,免疫印迹试验和间接免疫荧光试验均表明,所表达的外源蛋白能够与 TGEV 免疫血清发生反应,表明重组 S 蛋白与 TGEV 天然抗原一样具有相同的抗原性。以此重组的乳酸乳球菌口服免疫小鼠,不同时间测定肠道粪便中抗体 sIgA 的结果表明,重组乳酸乳球菌可有效的刺激小鼠肠道免疫系统产生特异性免疫应答,初步证明了以该菌作为口服疫苗的可行性。重组菌口服接种小鼠后未见有在增重和食欲等方面的不良影响,说明重组菌对动物是安全的。

目前普遍认为,在宿主细胞表面表达外源抗原,是活载体疫苗向黏膜免疫系统提呈抗原的最佳方式^[19]。本研究所使用的 pNZ8112 表达载体,具有 ssUSP 分泌信号肽,属分泌型表达载体。经诱导表达后,对其培养物上清液 10 倍浓缩后进行目的蛋白的检查,结果未检测到表达的 S 蛋白,菌体裂解物经 SDS-PAGE 分析可见在预期的分子量大小有目的蛋白的表达,Western blot 检测也证实表达蛋白存在于菌体上,诱导表达后的活菌体免疫荧光试验表明,所表达的蛋白初步定位于菌体的表面,存在菌体表面的目的蛋白,为抗原物质有效刺激免疫系统,提高抗体水平奠定了重要的物质基础。

参 考 文 献

- [1] Saif LJ, Wesley RD. Transmissible gastroenteritis virus. In: Diseases of Swine (7th edition, Ed). Leman AD, Straw BE, Mengeling WL, et al. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1992, 362-386.
- [2] Staats HF, Jackson RJ, Marinaro M, et al. Mucosal immunity to infection with implications for vaccine development. *Curr Opin Immunol*, 1994, 6(4): 572-583.
- [3] Alander M, Satokari R, Korpela R, et al. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(1): 351-354.
- [4] Cesena C, Morelli L, Alander M, et al. *Lactobacillus crispatus* and its non-aggregating mutant in human colonization trials. *J Dairy Sci*, 2001, 84(5): 1001-1010.
- [5] Russell-Jones GJ. Oral vaccine delivery. *J Control Release*, 2000, 65(1-2): 49-54.
- [6] Chen H. Recent advances in mucosal vaccine development. *J Control Release*, 2000, 67(2-3): 117-128.
- [7] Cavanagh D. Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch Virol*, 1997, 142(3): 629-633.
- [8] Kreml C, Schultze B, Laude H, et al. Point mutations in the S protein connects the sialic acid binding activity with the enteropathogenicity of transmissible gastroenteritis coronavirus. *J Virol*, 1997, 71(4): 3285-3287.
- [9] Schultze B, Kreml C, Ballesteros ML, et al. Transmissible gastroenteritis coronavirus, but not the related porcine respiratory coronavirus, has a sialic acid (N-glycolylneuraminic acid) binding activity. *J Virol*, 1996, 70(8): 5634-5637.
- [10] Delmas B, Gelfi J, Laude H. Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus. II. Domains in the peplomer glycoprotein. *J Gen Virol*, 1986, 67(Pt 7): 1405-1418.
- [11] Jiménez G, Correa I, Melgosa MP, et al. Critical epitopes in transmissible gastroenteritis virus neutralization. *Virol*, 1986, 60(1): 131-139.
- [12] Laude H, Gelfi J, Lavanant L, et al. Single amino acid changes in the viral glycoprotein M affect induction of alpha interferon by the coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *J Virol*, 1992, 66(2): 743-749.
- [13] 任晓峰,李一经,李广兴等.猪传染性胃肠炎病毒 TH-98 株 S 基因的克隆与同源性比较.中国兽医杂志, 2002, 38(7): 3-6.
- [14] Anderson DG, McKay LL. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from *Lactic streptococci*. *Appl Environ Microbiol*, 1983, 46(3): 549-552.
- [15] Holo H, Nes IF. High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl Environ Microbiol*, 1989, 55(12): 3119-3123.
- [16] Underdown BJ, Mestecky J. Mucosal immunoglobulin. In: Ogra P, Mesteck J, Lamm ME, et al. Handbook of mucosal immunology. Boston: Academic Press, 1994, 79-98.
- [17] Brandtzaeg P. Distribution and characteristics of mucosal immunoglobulin-producing cells. In: Handbook of immunology. Boston: Academic Press, 1994, 251-279.
- [18] Bermudez-Humaran LG, Langella P, Cortes-Perez NG, et al. Intranasal immunization with recombinant *Lactococcus lactis* secreting murine interleukin-12 enhances antigen-specific Th1 cytokine production. *Infect Immun*, 2003, 71(4): 1887-1896.
- [19] 史达,宋岩,李一经.乳酸乳球菌作为黏膜免疫活载体疫苗传递抗原的研究进展.微生物学报, 2006, 46(4): 680-

Construction of recombinant *Lactococcus lactis* expressing porcine transmissible gastroenteritis spike glycoprotein and analysis of immunogenicity

TANG Li-jie ,OU Di ,GE Jun-wei ,XU Yi-gang ,LI Yi-jing*

(College of Veterinary Medicine ,North East Agricultural University ,Harbin 150030 ,China)

Abstract :Transmissible gastroenteritis virus (TGEV) , is an enteropathogenic coronavirus that causes a highly fatal acute diarrhea in newborn pigs . It 's typically clinical manifestations consist of omitting , severe diarrhea , loss water and highly infectious disease . All kinds and ages of pigs can be infected . Particular , the mortality piglets under 3 weeks may reach 100% . The effective protection against TGEV requires the development of vaccines that are able to induce local mucosal immunization . *Lactococcus lactis* was selected as a bacterial carrier for the expression of TGEV spike glycoprotein . The gene of S glycoprotein was cloned into the *Lactococcus lactis* vectors pNZ8112 . An approximately 2000bps fragments of TGEV gene S that encompasses all the four major antigenic domains critical for neutralization was transformed into *Lactococcus lactis* NZ9000 by electroporation , resulting in the recombinant strain pNZ8112-Sa/NZ9000 . The recombinant glycoprotein S was detected by SDS-PAGE and Western blot after induced by 1ng/mL nisin . The result indicated that the expressed product maintain the antigenicity of TGEV as expected . In order to detect the location of expressed protein , the yellow and green fluorescence of the recombinant strain pNZ8112-Sa/NZ9000 was detected by the IFA experiments , which indicated that the expressed recombinant protein was secreted and located on the surface of the bacterium cell . Oral immunization of BALB/c mice with recombinant strain that constitutively express the 66kDa fragment of the glycoprotein S , Specific anti-TGEV glycoprotein S secret immunoglobulin A (sIgA) antibodies were detected by indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in the feces after immunization . It was showed that the mice immunized with pNZ8112-Sa/NZ9000 recombinant strain had produced clear antibody level anti TGEV , and which had provided important substance foundation and explored the feasibility of *Lactobacillus* as oral vaccine .

Keywords : TGEV S glycoprotein ; *Lactococcus lactis* ; surface expression ; immunogenicity analysis

Foundation item :National Natural Sciences Foundation of China (30371074)

* Corresponding author . Tel : 86-451-55190385 ; E-mail : yijingli@yahoo.com

Other authors :SHI Da ,XIA Chun-li ,YU Yin

Received : 5 July 2006/ Accepted : 4 September 2006/ Revised : 8 November 2006

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>